

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(12)

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(21) Numéro de dépôt: 89440058.9

(51) Int. Cl.⁵: C 07 K 7/10
A 61 K 37/02

(22) Date de dépôt: 21.06.89

(30) Priorité: 24.06.88 FR 8808892

(43) Date de publication de la demande:
03.01.90 Bulletin 90/01

(84) Etats contractants désignés:
AT BE CH DE ES GB GR IT LI LU NL SE

(71) Demandeur: CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE, ETABLISSEMENT PUBLIC NATIONAL A
CARACTERE SCIENTIFIQUE ET TECHNOLOGIQUE (CNRS)
15, Quai Anatole France
F-75700 Paris (FR)

(72) Inventeur: Hoffmann, Jules Lab. de Biologie Générale
12, rue de l'Université
F-67000 Strasbourg (FR)

Lambert, Jean Lab. de Biologie Générale
12, rue de l'Université
F-67000 Strasbourg (FR)

Dimarcq, Jean-Luc Lab. de Biologie Générale
12, rue de l'Université
F-67000 Strasbourg (FR)

Keppi, Elizabeth Lab. de Biologie Générale
12, rue de l'Université
F-67000 Strasbourg (FR)

Reichhart, Jean-Marc Lab. de Biologie Générale
12, rue de l'Université
F-67000 Strasbourg (FR)

Hoffmann, Danièle Lab. de Biologie Générale
12, rue de l'Université
F-67000 Strasbourg (FR)

Fothergill, John
Department of Biochemistry University of Aberdeen
Marischal College Aberdeen AB9 1AS (GB)

Van Dorselaer, Alain Lab. de Chimie Organique
des Substances Naturelles Centre de Neurochimie
5, rue Blaise Pascal 67000 Strasbourg (FR)

Luu, Bang Lab. de Chimie Organique
des Substances Naturelles Centre de Neurochimie
5, rue Blaise Pascal 67000 Strasbourg (FR)

(73) Mandataire: Nuss, Pierre et al
10, rue Jacques Kablé
F-67000 Strasbourg (FR)

(54) Molécules peptidiques à action sur les germes à Gram positif.

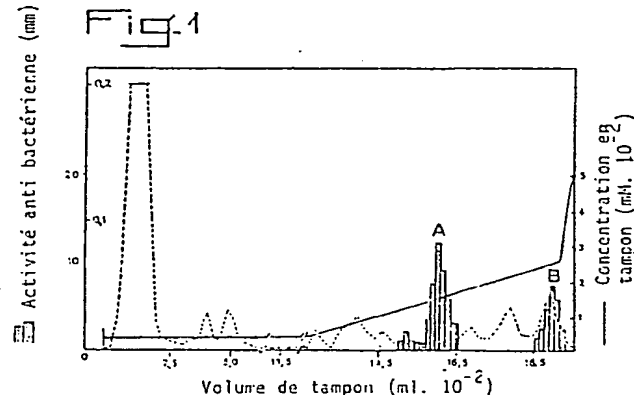
(57) La présente invention concerne des molécules peptidiques à action sur les germes à Gram positif.

Molécules caractérisées en ce qu'elles présentent la définition suivante :

peptides basiques de 40 acides aminés comportant 6 cystéines engagées dans 3 ponts disulfure, synthétisées par des larves de l'insecte *Phormia terranova* après immunisation, ces molécules ayant une activité contre des germes à Gram positif.

Leurs séquences sont comme suit:

1	10	20	30	40	
ATCDLLSGTG	INHSACAHC	LLRGNRGGYC	NGKGVVCVRN	(A)	
1	10	20	30	40	
ATCDLLSGTG	INHSACAHC	LLRGNRGGYC	NRKGVVCVRN	(B)	



Description

Molécules peptidiques à action sur les germes à Gram positif

La présente invention concerne les domaines de la médecine humaine et vétérinaire, phytosanitaire et de l'industrie alimentaire et a pour objet des molécules peptidiques à action sur les germes à Gram positif.

Il est connu, depuis longtemps, que les insectes sont capables de réactions immunitaires très efficaces. A titre d'exemple, il est possible de réaliser toutes sortes d'interventions chirurgicales sur des insectes sans prendre les moindres précautions d'asepsie, ces opérations n'entraînant jamais de septicémie. Ceci est dû au fait que la réponse immunitaire des insectes fait intervenir, dans un délai court, à savoir de l'ordre de quatre à six heures, la production de plusieurs peptides antibactériens présentant généralement un large spectre d'action.

Ainsi, il a été isolé et caractérisé, chez des Lépidoptères, deux familles de peptides antibactériens induits au cours de la réponse immunitaire, à savoir les cécropines et les attacines.

Un travail sur un autre groupe d'insectes, les Diptères, a permis d'isoler et de caractériser trois molécules, très voisines entre elles et très différentes des cécropines, ces molécules étant des antibiotiques tout à fait nouveaux qui sont synthétisées par lesdits insectes dans les heures suivant une blessure. Ces trois molécules sont connues sous la dénomination diptéricine A, B et C et sont des peptides antibactériens basiques de 9 K dont le spectre d'action est large au sein des bactéries à Gram négatif (à titre d'exemple, la masse moléculaire de la diptéricine A est de 8621 Da). Les résultats de ce travail ont été publiés notamment dans *European Journal of Biochemistry* vol. 171, pages 17 à 22, (1988). En effet, dans cette publication, il est traité de la synthèse de molécules à partir des larves du diptère *Phormia terranova*. Ces études ont également fait l'objet de publications dans les *COMPTES RENDUS DE L'ACADEMIE DES SCIENCES PARIS*, vol. 303, no. 5, 15 juillet 1986, "Série III SCIENCES DE LA VIE", pages 155-160, Académie des Sciences ; E. KEPPI et al. : "IMMUNOLOGIE - Recherches sur les mécanismes de défense antibactérienne chez les insectes ; isolement de peptides antibactériens dans l'hémolymphe du Diptère *Phormia terranova*" - et au document *BIOLOGICAL ABSTRACTS*, vol. 81, no. 11, 1986, page AB-554, no. 102712, Philadelphie, PA., US ; E. KEPPI et al. : "Induced antibacterial proteins in the hemolymph of *Phormia terranova* (Diptera) : Purification and possible origin of the one protein" & *INSECT BIOCHEM* 16(2) ; 395-402 1986.

Cependant, ces nouvelles molécules, à l'état purifié, ne sont pas ou sont seulement faiblement actives sur les germes à Gram positif. Les diptéricines tuent les bactéries en phase exponentielle de croissance et le résultat de leur action est une lyse cellulaire.

En effet, on connaît, d'après ces documents, une analyse en acides aminés faisant état d'une séquence peptidique sans cystéine, et les molécules obtenues présentent une masse moléculaire de l'ordre de 9000 Da. Ces molécules peptidiques sont uniquement actives contre les bactéries Gram négatif.

La présente invention a pour objet des molécules peptidiques à action sur les germes à Gram positif.

Conformément à l'invention, ces molécules présentent la définition suivante : peptides basiques de 40 acides aminés comportant 6 cystéines engagées dans 3 ponts disulfure, synthétisées par des larves de l'insecte *Phormia terranova* après immunisation, ces molécules ayant une activité contre des germes à Gram positif.

L'invention sera mieux comprise grâce à la description ci-après, qui se rapporte à un mode de réalisation préféré, donné à titre d'exemple non limitatif, et expliqué avec référence aux dessins schématiques annexés, dans lesquels :

la figure 1 est un diagramme représentant la séparation par chromatographie échangeuse de cations des protéines à activité anti-*Micrococcus luteus*, synthétisées par des larves de *Phormia terranova* immunisées ;

les figures 2 et 3 sont des diagrammes représentant la purification de deux molécules peptidiques par chromatographie liquide à haute performance en phase inverse, et

la figure 4 représente un spectre antibactérien d'une molécule conforme à l'invention.

L'isolement et la caractérisation des nouvelles molécules peptidiques conformes à l'invention s'effectuent de la manière suivante :

Des larves de troisième stade du Diptère *Phormia terranova* sont blessées par piqûre à l'aide d'une aiguille préalablement contaminée dans une culture bactérienne, par exemple *Enterobacter cloacae* en phase exponentielle de croissance, afin qu'elles entament leur processus d'immunisation. Au bout de 24 heures, du sang est prélevé par incision de la cuticule et les cellules sanguines sont enlevées par centrifugation à 36000 g pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant obtenu est chauffé, ensuite, pendant 4 minutes à 100°C, après addition d'acide acétique. Après centrifugation des protéines thermolabiles précipitées, le surnageant est appliqué sur une colonne de chromatographie échangeuse de cations équilibrée avec un tampon d'acétate d'ammonium de 40 mM et de pH 6,8. Après rinçage de la colonne avec le même tampon, les protéines fixées sont éluées par un gradient linéaire d'une solution d'acétate d'ammonium de molarité comprise entre 40mM et 500mM. Par cette technique connue, il est possible d'isoler des peptides actifs contre *Micrococcus luteus* par test d'étalement sur agar ou sur géloseensemencés de germes bactériens. La figure 1 des dessins annexés représente le diagramme de séparation correspondant, dans lequel l'activité antibactérienne en millimètres de diamètre d'étalement est indiquée sur l'ordonnée de gauche, la concentration en tampons, en mM . 10⁻², sur l'ordonnée de droite et le volume de tampons, en ml . 10⁻² en abscisse.

Ensuite, les molécules obtenues sont filtrées sur cartouche connue sous la dénomination commerciale Sep Pack C18 Waters et purifiées en chromatographie liquide à haute performance en phase inverse, couramment appelée HPLC phase inverse sur une colonne connue du type Baker-Bond C18 WP avec élution par gradient linéaire d'acétonitrile. Les figures 2 et 3 des dessins annexés représentent l'évolution des diagrammes de purification de deux molécules conformes à l'invention en fonction du temps de rétention indiqué en abscisse et du taux d'acétonitrile.

Le procédé décrit ci-dessus permet l'obtention, sous forme pure, de protéines anti-*Micrococcus luteus* représentées par les pics A et B aux figures 1 à 3.

Conformément à une caractéristique de l'invention, la molécule présente la séquence peptidique suivante :

1	10	20	30	*	40	
ATCDLLSGTG	INHSACAAHC	LLRGNRGGYC	NGKGVVCVRN			(A)

Selon une autre caractéristique de l'invention, la molécule présente la séquence peptidique suivante :

1	10	20	30	*	40	
ATCDLLSGTG	INHSACAAHC	LLRGNRGGYC	NRKGVVCVRN			(B)

Les séquences peptidiques représentées ci-dessus se caractérisent par la présence de six cystéines en position homologue, tous les résidus étant identiques à l'exception du résidu 32 désigné par un *, qui est une glycine dans la première molécule et une arginine dans la deuxième molécule. Ce remplacement explique le comportement différentiel des molécules précitées (A) et (B) en chromatographie échangeuse de cations, la dernière molécule (B) citée présentant un résidu, l'arginine, ayant plus de charges positives. Les pics A et B de la figure 1 des dessins annexés correspondent respectivement à la première et à la seconde molécules précitées.

Une mesure de la masse chimique des molécules précitées (A) et (B) a été réalisée par spectrométrie de masse en mode à bombardement par atome rapide positif en utilisant une résolution suffisamment basse, R étant égal à 1000, afin que le massif pseudo-moléculaire protoné apparaisse comme un pic homogène. Dans ces conditions, la masse moléculaire mesurée pour la molécule (A) s'est établie à 4060,22 Da pour une masse attendue (calculée) de 4060,21 Da et celle mesurée pour la molécule (B) s'est établie à 4159,16 Da pour une masse attendue de 4159,35 Da. Cette mesure correspond à la forme oxydée des six cystéines, à savoir comporte six unités de masse en moins par rapport à la structure moléculaire calculée à partir de la structure primaire établie, prouvant que trois ponts cystéines sont formés. Une mesure de masse mono-isotopique, pour la molécule (A) a permis d'établir une masse de 4057,90 Da pour une masse attendue de 4057,81 Da.

L'activité des molécules peptidiques conformes à l'invention a été testée sur différentes souches bactériennes par un test d'ensemencement sur agar ou gélose. A cet effet, un spectre antibactérien de la molécule (A) a été réalisé à raison de 800 ng par essai sur les germes à Gram positif suivants :

1. *Micrococcus luteus*, et
2. *Bacillus megaterium*
3. à 7. *Bacillus subtilis*, suivant souches S3, Mo201, 6633, QB122 et QB935,
8. à 10. *Bacillus thuringiensis*, suivant souche Sm^r, Rif^r et 53137, et
11. *Staphylococcus aureus*, ainsi que sur
12. à 14. *Escherichia coli*, suivant souche D 31, BZB1011 et 7624,
15. *Enterobacter cloacae* (souche β 12) et
16. *Pseudomonas aeruginosa*.

Le spectre antibactérien obtenu, représenté à la figure 4 des dessins annexés, a permis de constater que les molécules conformes à l'invention sont actives sur les germes à Gram positif : *Micrococcus luteus* et *Bacillus megaterium*, de manière très efficace et, avec une efficacité un peu moindre sur les autres germes à Gram positif, à savoir *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis* et *Staphylococcus aureus*, alors qu'elles ne sont pas actives sur les germes à Gram négatif : *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Les nouvelles molécules peptidiques conformes à l'invention peuvent avantageusement être utilisées pour l'obtention d'un médicament. Un tel médicament peut avantageusement servir comme agent antibactérien.

Selon une autre caractéristique de l'invention, les nouvelles molécules peptidiques ont une action bactéricide sur les germes à Gram positif. Cette caractéristique a été démontrée par une série d'expériences in vitro. La cible principale des molécules conformes à l'invention est la membrane cytoplasmique des bactéries. Ces molécules sont bactéricides mais ne sont pas bactériolytiques.

Les molécules conformes à l'invention, qui pourraient avantageusement être appelées phormicines (du nom de l'insecte *Phormia terranova*), sont de nouveaux antibiotiques de taille relativement petite à spectre d'action spécifique pour les germes à Gram positif. Ces molécules sont plus particulièrement applicables dans les domaines de l'industrie alimentaire, phytosanitaire et de la médecine humaine et vétérinaire. Leur utilisation

dans le domaine agro-alimentaire, en particulier comme peptides antibactériens inductibles d'insectes est particulièrement intéressante.

Les gènes des molécules peptidiques conformes à l'invention peuvent également être clonés et les gènes (ou les ADN complémentaires) peuvent être introduits dans plusieurs systèmes d'expression tels que la levure ou le baculovirus, ou être produites en masse en fermentateurs. Ces molécules peuvent également être utilisées dans des procédés de mutagenèse afin d'isoler des mutants ayant de nouvelles propriétés antibactériennes. De même, les gènes codant pour ces molécules peuvent être introduits dans des plantes afin d'augmenter leur résistance à des agents pathogènes.

Les molécules peptidiques selon l'invention constituent, en outre, les compléments indispensables d'une stratégie biotechnologique basée sur l'utilisation des cécropines et des diptéricines qui agissent sur des germes à Gram négatif. Par ailleurs, leur faible taille et leur résistance au traitement à la chaleur et aux conditions acides présentent également un aspect très favorable pour une utilisation biotechnologique. De plus, ces nouvelles molécules peuvent agir, dans le domaine de l'industrie alimentaire, comme agent empêchant la contamination par des germes à Gram positif, pendant la fabrication et, après la fabrication, comme agent conservateur. Dans le domaine phytosanitaire, ces molécules peuvent être utilisées en lieu et place des produits chimiques usuels.

Dans le cas de sélection d'analogues, après mutagenèse du gène, pour une adaptation à des besoins spécifiques des industries agro-alimentaires et pharmaceutiques, ces analogues peuvent être intégrés dans des souches de levure ou de bactéries lactiques couramment utilisées en production, afin d'éliminer les contaminations bactériennes nocives parfois présentes dans ces produits.

Dans le domaine phytosanitaire, les gènes correspondant aux mutants donnant des peptides efficaces, peuvent éventuellement être intégrés dans le génome de plantes choisies afin de les rendre plus résistantes à des maladies d'origine bactérienne.

Bien entendu, la présente invention ne se limite nullement aux indications et aux applications décrites. D'autres indications et applications sont possibles, ainsi que des modifications aux indications et aux applications décrites, sans sortir pour autant du domaine de protection de l'invention.

Revendications

1. Molécules peptidiques caractérisées en ce qu'elles présentent la définition suivante : peptides basiques de 40 acides aminés comportant 6 cystéines engagées dans 3 ponts disulfure, synthétisées par des larves de l'insecte *Phormia terranova* après immunisation, ces molécules ayant une activité contre des germes à Gram positif.

2. Molécule suivant la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle présente la séquence peptidique suivante :

1	10	20	30	*	40	
ATCDLLSGTG	INHSACAAHC	LLRGNRGGYC	NGKGVVCVRN			(A)

3. Molécule suivant la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle présente la séquence peptidique suivante :

1	10	20	30	*	40	
ATCDLLSGTG	INHSACAAHC	LLRGNRGGYC	NRKGVVCVRN			(B)

4. Utilisation de molécules suivant l'une quelconque des revendications 1 à 3 pour l'obtention d'un médicament.

5. Utilisation de molécules suivant l'une quelconque des revendications 1 à 3 pour l'obtention d'un produit de traitement phytosanitaire.

6. Utilisation de molécules suivant l'une quelconque des revendications 1 à 3 comme agent antibactérien.

7. Utilisation de molécules suivant l'une quelconque des revendications 1 à 3 comme agent antibactérien sur les germes à Gram positif.

8. Utilisation de molécules suivant l'une quelconque des revendications 1 à 3 comme agent bactéricide.

9. Utilisation de molécules suivant l'une quelconque des revendications 1 à 3 comme agent antibactérien sur les germes à Gram positif dans le domaine de l'industrie alimentaire.

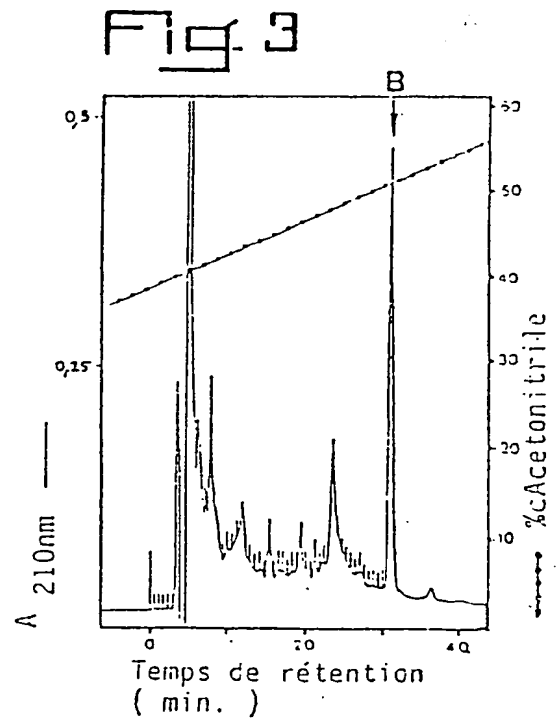
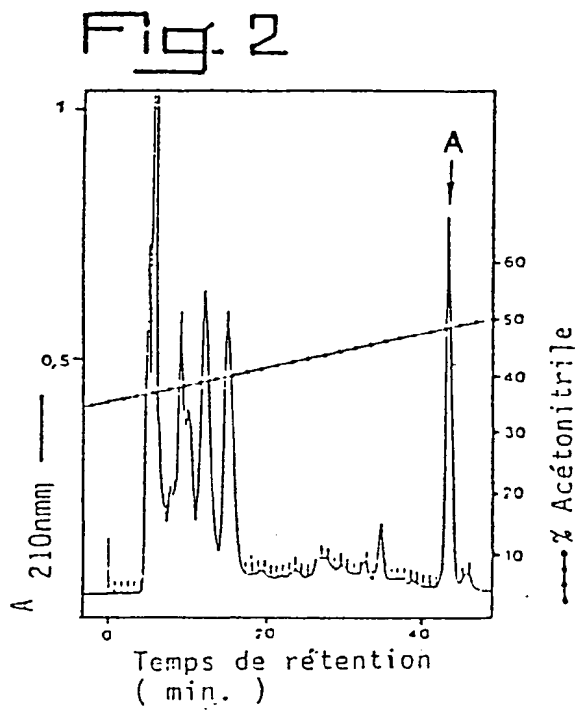
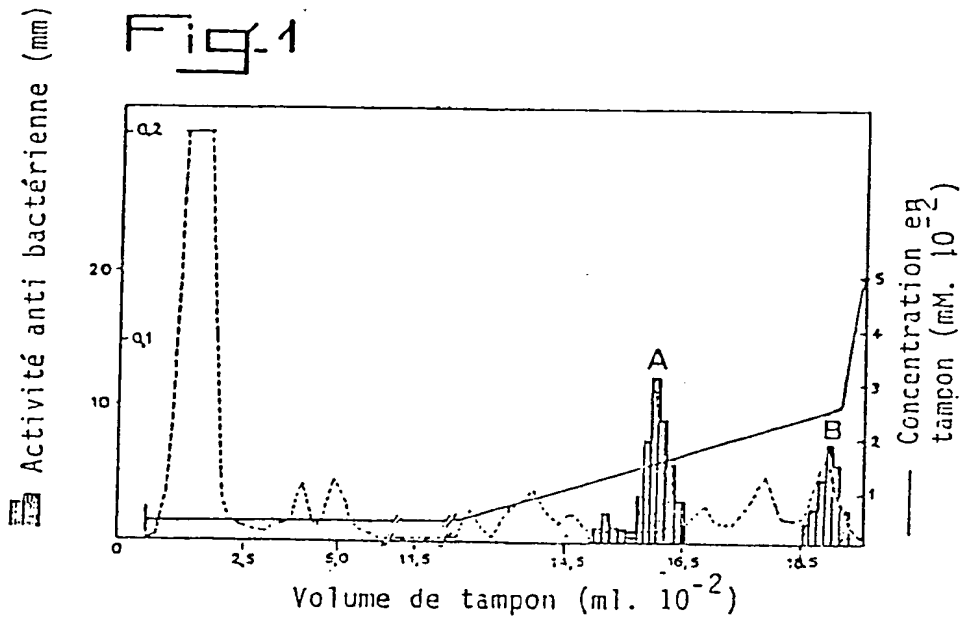
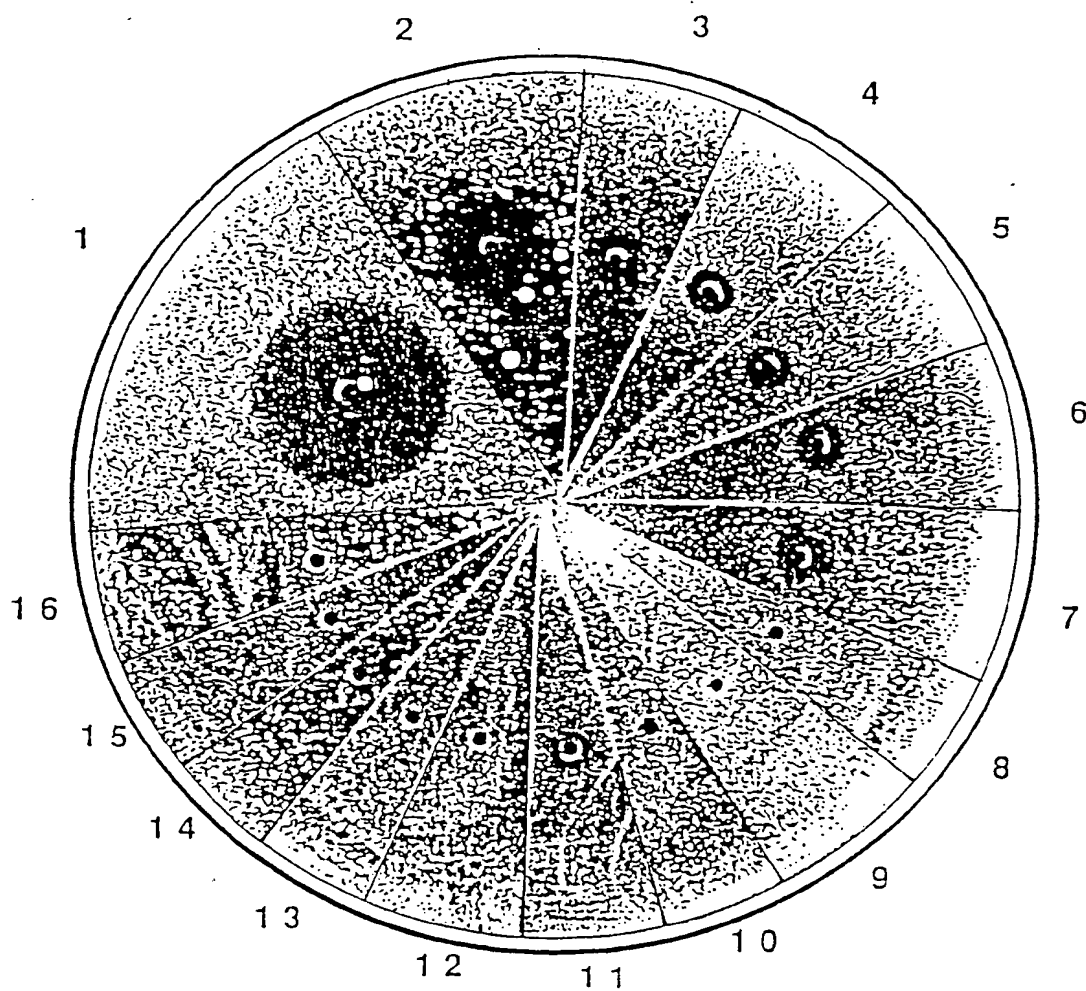


Fig. 4





Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numero de la demande

EP 89 44 0058

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Categorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.4)
Y	COMPTES RENDUS DE L'ACADEMIE DES SCIENCES PARIS, vol. 303, no. 5, 15 juillet 1986, "Série III SCIENCES DE LA VIE", pages 155-160, Académie des Sciences: E. KEPPI et al.: "Immunologie. Recherches sur les mécanismes de défense antibactérienne chez les insectes: isolement de peptides antibactériens dans l'hémolymph du Diptère Phormia terranovae" * En entier *	1-4	C 07 K 7/10 A 61 K 37/02
Y	BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. 81, no. 11, 1986, page AB-554, résumé no. 102712, Biological Abstracts, Inc., Philadelphia, PA, US; E. KEPPI et al.: "Induced antibacterial proteins in the hemolymph of Phormia terranovae (Diptera): Purification and possible origin of the one protein", & INSECT BIOCHEM 16(2): 395-402 1986 * Résumé *	1-4	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.4) C 07 K A 61 K
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 06-10-1989	Examineur RAJIC M.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			

EP0 FORM 1503 01.82 (P0402)

THIS PAGE BLANK (USPTO)